高効率リアルタイムPCR用マスターミックス「KOD SYBR® qPCR Mix」を用いた次世代シーケンサー用ライブラリー定量の事例

東洋紡（株）　敦賀バイオ研究所　永友 寛一郎

はじめに

近年急速に普及している次世代シーケンサー（NGS）解析において、ライブラリーの正確な定量は、適正なリード数を得るために非常に重要です。そこで、アダプターを付加したライブラリーの定量方法としてリアルタイムPCRが用いられています。しかし、インサートの平均サイズが200bp以上であるため、市販のリアルタイムPCR試薬を使用することができないという難点がありました。

KOD SYBR® qPCR Mixは、KOD DNA polymerase（KOD）を使用したSYBR® Green I 検出系によるリアルタイムPCR用マスターミックスです。3'→5' エキソヌクレアーゼ活性（校正活性）を除去したKOD exo (-) DNA polymeraseと最適化されたバッファー条件を組み合わせることで、KODの優れた合成能を最大限に発揮し、80%を超えるようなGCリッチなターゲットや長鎖ターゲット（～2kb）の定量的な増幅においても安定したリアルタイムPCR測定が可能になっています。

今回は、本キットを用いて、illumina®社シーケンサー解析用にライブラリーの定量を行った例をご紹介いたします。

方　法

（1）ライブラリー調製

RNA-seq解析用ライブラリー A-Dは、哺乳類細胞 total RNAからTruSeq® Standard mRNAサンプル調製キット（illumina®社）を用いて調製しました。

（2）ライブラリーの定量

サンプル：スタンダードDNA［PhiX Control Kit v3（illumina®社, インサート長平均375bp）を希釈調製したもの］及び（1）で調製したRNA-seq 解析用ライブラリー

プライマー配列：Primer #1:AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG AT（23bp）
Primer #2:CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA（21bp）

【反応組成】

DW	Xμl
KOD SYBR® qPCR Mix	10μl
10pmol/μl Primer #1	0.4μl
10pmol/μl Primer #2	0.4μl
50×ROX reference dye	0.04μl
スタンダードDNAまたはライブラリー*	Yμl
total	20μl

*スタンダードDNAは20pMから0.1%Tween20で段階希釈して用いました。
ライブラリーはMultiNA（DNA/RNA分析用マイクロチップ電気泳動装置，島津製作所）を用いて測定したDNA濃度を元に4pMに希釈調製してqPCRに用い、実際タグがついているものの濃度を測定しました。

【PCRサイクル】

95℃, 10 min.
↓
（95℃, 10 sec. －60℃, 30 sec.）×40cycles
↓
Melting

＊Data collectionは伸長ステップに設定しました。

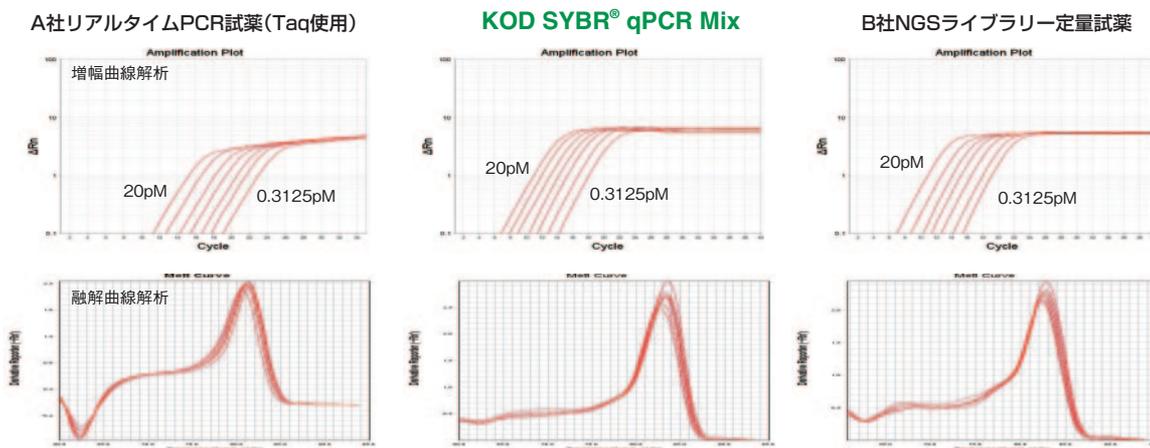
【使用機器】Applied Biosystems® 7500 Fast

※比較のため、他のリアルタイムPCR試薬でも、取扱説明書推奨の条件にてリアルタイムPCRを実施し、比較を行いました。
なお、リアルタイムPCR機種により最適ROX量が変わる可能性があります。取扱説明書をご参照ください。

結果および考察

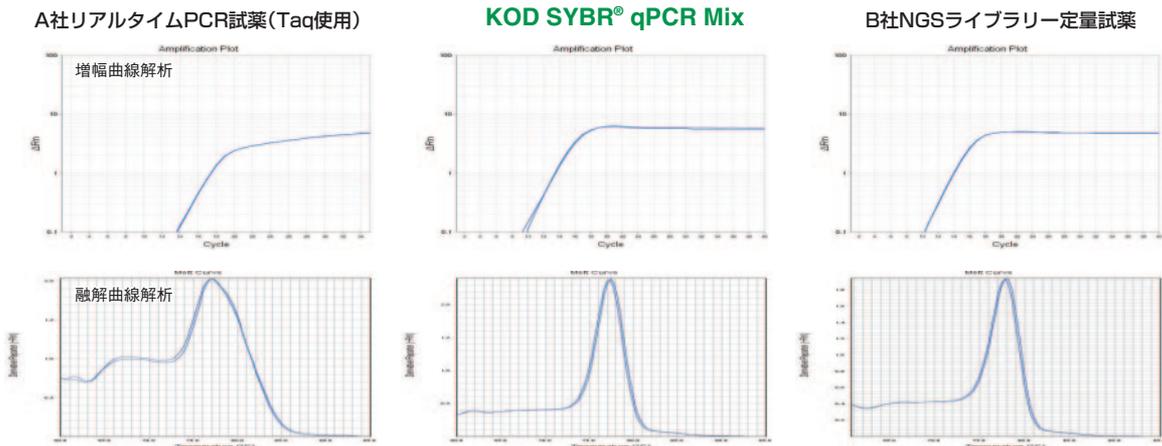
（1）段階希釈したスタンダードDNAを用いた解析結果

A社リアルタイムPCR試薬（Taq使用）

KOD SYBR® qPCR Mix

B社NGSライブラリー定量試薬

（2）RNA-seq 解析用ライブラリーを用いた解析結果

4pMに希釈したRNA-seq解析用ライブラリーA（平均長:約260bp）を用いて解析を行いました。

A社リアルタイムPCR試薬（Taq使用）

（3）ライブラリー濃度 定量結果

	ライブラリー濃度（nM）		
	A社リアルタイムPCR試薬（Taq使用）	KOD SYBR® qPCR Mix	B社NGSライブラリー定量試薬
A	2,736	629	600
B	5,028	548	518
C	195	44	51
D	2,174	575	579

RNA-seq解析用ライブラリーを市販のスタンダードDNAを指標として定量を行ったところ、KOD SYBR® qPCR Mixでは、B社ライブラリー定量試薬とほぼ同等の値を得ることができました。一方、A社リアルタイムPCR試薬では、ライブラリー濃度が一桁多く見積もられてしまいました。

ライブラリー定量では、通常のリアルタイムPCRのターゲット長（～200bp）に比べて必要な増幅長が平均260bpと長いため、Taqポリメラーゼを使用したリアルタイムPCR試薬では、非特異的増幅や立ち上がりの遅れにより、正しく定量できないケースがあるようです。

（4）定量後のillumina®社シーケンサー解析結果

【使用機器】 illumina®社 MiSeq®

ライブラリーA

Read 1

Lane	Tiles	Dencity (K/mm2)	Cluster PF (%)	Phas/Prephas (%)	Reads (M)
1	38	1059+/-19	95.13+/-0.43	0.182 / 0.078	26.07

Read 2

Lane	Tiles	Dencity (K/mm2)	Cluster PF (%)	Phas/Prephas (%)	Reads (M)
1	38	1059+/-19	95.13+/-0.43	0.186 / 0.073	26.07

ライブラリーB

Read 1

Lane	Tiles	Dencity (K/mm2)	Cluster PF (%)	Phas/Prephas (%)	Reads (M)
1	38	1157+/-33	93.89+/-0.73	0.161 / 0.092	28.32

Read 2

Lane	Tiles	Dencity (K/mm2)	Cluster PF (%)	Phas/Prephas (%)	Reads (M)
1	38	1157+/-33	93.89+/-0.73	0.154 / 0.071	28.32

KOD SYBR® qPCR Mixを用いて見積もられた濃度をもとにライブラリー濃度が最適となるように希釈し、ライブラリーAとBにてシーケンス解析を実施しました。その結果、NGS解析で重要となるDensity、Cluster PFともに推奨範囲内（800～1300k/mm²，80%以上）であり、適切にライブラリーを定量できたと考えられました。

まとめ

本事例でお示ししたように、KOD SYBR® qPCR Mixを使用することで、市販のNGSライブラリー定量試薬と同等の正確なライブラリーの定量が可能です。また、KOD SYBR® qPCR Mixは、コストパフォーマンスに優れ、GC含量が高いターゲットや長鎖ターゲットでも増幅可能であるため、ライブラリー定量以外にも様々な用途に応用可能であると考えられます。是非一度、KOD SYBR® qPCR Mixをお試しください。

品名および内容	包　装	保存温度	Code No.	価　格
KOD SYBR® qPCR Mix ・KOD SYBR® qPCR Mix ・50×ROX reference dye	1ml×1本〔40回用〕	-20℃	QKD-201T	¥9,800
	1.67ml×3本〔200回用〕	-20℃	QKD-201	¥32,000
	（1.67ml×3本）×5〔1,000回用〕	-20℃	QKD-201X5	¥147,000

※50×ROX reference dyeがマスターミックスとは、別添付されています。
※包装欄に記載の反応回数は、50μl反応時のものです。容量は、KOD SYBR® qPCR Mixのみ示しています。